

This document has been downloaded from
TamPub – The Institutional Repository of University of Tampere

 *Publisher's version*

The permanent address of the publication is <http://urn.fi/URN:NBN:fi:uta-201310041449>

Author(s): Valanne, Susanna; Rämet, Mika
Title: Banaanikärpänen : geneettisesti verraton mallieläin tutkimukseen
Year: 2011
Journal Title: Duodecim
Vol and number: 127 : 19
Pages: 2063-2071
ISSN: 0012-7183
Discipline: Biochemistry, cell and molecular biology; Plant biology, microbiology, virology; Genetics, developmental biology, physiology
School /Other Unit: Institute of Biomedical Technology
Item Type: Journal Article
Language: fi
URN: URN:NBN:fi:uta-201310041449
URL: <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo99796.pdf>

All material supplied via TamPub is protected by copyright and other intellectual property rights, and duplication or sale of all part of any of the repository collections is not permitted, except that material may be duplicated by you for your research use or educational purposes in electronic or print form. You must obtain permission for any other use. Electronic or print copies may not be offered, whether for sale or otherwise to anyone who is not an authorized user.

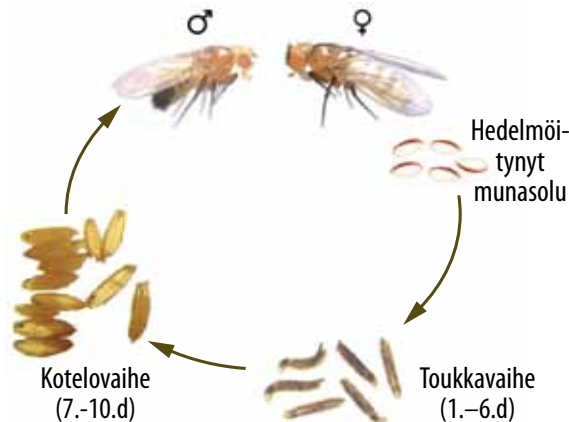
Banaanikärpänen – geneettisesti verraton mallieläin tutkimukseen

Drosophila melanogaster eli tummavatsainen kasteenrakastaja, suomeksi banaanikärpänen, on loppukesiltä tuttu vitsaus. Meidän kaikenlaisten lentävien hyönteisten riivaamassa maassa asuvien on vaikea ajatella tutkimuksen apulaiseksi eettisessä mielessä paremmin sopivaa mallieläintä. Banaanikärpänen on geneettisessä muunneltavuudessaan mainio tutkimusmalli, jonka käyttö suomalaisessa lääketieteellisessä tutkimuksessa on ollut lähinnä tottumattomuuden vuoksi liian vähäistä. Esimerkiksi helposti saatavilla olevat siirtogeeniset RNAi-kannat ovat mahdollistaneet toiminnalliset genominlaajuiset seulonnat koko eliössä tai halutussa kudoksessa.

Banaanikärpänen on mahlakärpästen heimon kuuluva 2–3 mm:n pituinen ja noin milligramman painoinen hyönteinen. Se on kaksisiipinen, kellanruskea, raidallinen ja pu-

nasilmäinen. Banaanikärpäskoiraat ja -naaraat eroavat ulkonäöltään muun muassa siten, että koiraat ovat hieman naaraita pienempiä. Niiden takaruumis on myös kapeampi ja sen kärki tummempi (KUVA 1). Koiraan peräaukon ja sukupuolielimien ympärillä on piikkimäisiä karvoja, ja sen ensimmäisessä raajaparissa sijaitsevat sukaskimput (sex combs) puuttuvat naaraalta (Ashburner ym. 2005).

Banaanikärpäsen suosioon malliorganismina ovat vaikuttaneet erityisesti sen helppo kasvatettavuus, taudinkestävyys ja mutaatioiden synnyttämisen helppous. Banaanikärpästen kasvattaminen laboratoriossa on helppoa ja edullista, sillä kärpäset tuottavat paljon jälkeläisiä ja sukupolvien väli on lyhyt. Banaanikärpäsen kehitys hedelmöityneestä munasta aikuiseksi kärpäseksi vaihtelee jonkin verran lämpötilan mukaan kuten kaikilla vaihtolämpöisillä eläimillä; lyhimmillään kärpäsen kehitys munasta aikuiseksi vie seitsemän päivää 28 °C:ssa. Korkeammissa lämpötiloissa ke-



KUVA 1. Banaanikärpäsen kehitys hedelmöityneestä munasta aikuiseksi kärpäseksi 25 °C:ssa. Ensimmäisen vaiheen toukka kuoriutuu noin vuorokauden kuluttua hedelmöitymisestä. Toukka käy läpi kaksi nahanluontia ja yhteensä kolme toukkavaihetta, minkä jälkeen se koteloituu. Kotelovaihe ja muodonvaihdos kestävät noin 3–4 vrk, jonka jälkeen aikuiset kärpäset kuoriutuvat.

YDINASIAI

- » Banaanikärpistä on käytetty menestyksekkäästi geneettisen tutkimuksen mallieläimenä jo yli sadan vuoden ajan.
- » Banaanikärpisten ylläpito on helppoa, ja niiden käyttö nisäkkäisiin verrattuna on eettisempää.
- » Vajaan kahden viikon sukupolviväli yhdistettynä pitkälle kehitettyihin geneettisiin työkaluihin mahdollistaa monimutkaiset geneettiset koeasetelmat.
- » Banaanikärpäsellä on noin 14 000 geeniä, ja selvästi yli puolelle ihmisen tunnetuista tautigeeneistä on vastineeni.

hitys on hitaampaa lämpötilan aiheuttaman stressin vuoksi, eikä sitä tapahdu yli 33 °C:ssa lainkaan. Alemmissa lämpötiloissa kehitys hidastuu: 25 °C:ssa se vie noin kymmenen päivää (KUVA 1), 18 °C:ssa kuluu 19 päivää ja 12 °C:ssa kuluu yli 50 päivää (Ashburner ym. 2005).

Koska banaanikärpänen on selkärangaton, sitä pidetään eettisesti hyväksyttävänä eläinmallina. Periaatteena on, että jokaisen eläinlajin tulee olla perusteltu ja valitun mallieläimen evoluutioasteeltaan alin mahdollinen selvittävän asian kannalta. Banaanikärpänen on erittäin hyödyllinen väline erilaisia biologisia prosesseja tutkittaessa. Monet kärpäsen ulkoisista ominaisuuksista, kuten verkkosilmät, siipisuonet ja selässä olevat karvat (bristle), ovat hyviä mutaatiokohteita, sillä niissä tapahtuvat muutokset voidaan nähdä helposti mikroskoopilla (St Johnston 2002).

Banaanikärpäsgenetiikan tausta

Banaanikärpistä on käytetty laboratoriotutkimuksen mallieläimenä 1900-luvun alusta saakka, jolloin yhdysvaltalainen professori Thomas Hunt Morgan alkoi käyttää sitä perinnöllisyystieteen tutkimuksissaan. Morgan löysi banaanikärpäsmutantin, jolla oli normaalien punaisten silmien asemesta valkoiset

silmät. Hän osoitti risteytysten avulla, että valkosilmäisyyden aiheuttanut mutatoitunut geeni sijaitsee sukupuolen määräävässä X-kromosomissa (Morgan 1910). Hän päätteli, että geenit ylipäänsä sijaitsevat kromosomeissa. Kyseiset tutkimukset antoivat selityksen Mendelin perinnöllisyysteorialle ja toivat Morganelle Nobelin palkinnon vuonna 1933. Banaanikärpäsen perimä on pienikokoinen, noin $1,6 \times 10^8$ emäsparia. Se on noin kahdeskymmenesosa ihmisen tai hiiren perimän koosta (Yamamoto 2010). Geenejä *Drosophilalla* on noin 15 000 (Adams ym. 2000, Graveley ym. 2011) eli noin puolet ihmisen geenien määrästä. Banaanikärpäsen geeneillä on harvoin päällekkäisiä toimintoja, joten yksittäisen geenin mutaatio voidaan yleensä havaita yksilön ilmiössä. Nisäkkäillä, joiden perimässä monen geenin tuote voi hoitaa samaa tehtävää, yhden geenin mutaatiota ei useinkaan voida ilmiössä havaita. Analysoimalla *Drosophilan* eukromatiinisekvenssiä eli genomien aktiivista geenirikasta aluetta on havaittu, että kärpäsen ja nisäkkään geenit ovat hyvin samanlaisia (Adams ym. 2000, Myers ym. 2000, Rubin ym. 2000). Tunnetuista ihmisen geneettisten sairauksien geeneistä 75 %:lla on homologi banaanikärpäsessä (Reiter ym. 2001). Siten banaanikärpistä voidaankin käyttää useiden ihmisen tautien ja esimerkiksi solusignaaloinnin perusmekanismien tutkimiseen. Kärpäsessä on menestyksekkäästi mallinnettu muun muassa neurodegeneratiivisia sairauksia kuten Parkinsonin tautia, polyglutamiinitauteja (Myllykangas ja Heino 2006) sekä Alzheimerin tautia (Bonner ja Boulianne 2011). Banaanikärpätutkimuksissa on löytynyt useita näiden tautien patogeneesia sääteleviä geenejä eli modulaattoreita (Myllykangas ja Heino 2006, Bonner ja Boulianne 2011).

Banaanikärpäsen kromosomisto. Ennen molekyylibiologian tutkimusmenetelmien kehitystä kromosomitutkimuksessa oli tärkeää, että kromosomit pystyttiin visualisoimaan mikroskoopilla. Banaanikärpäsen toukan sylkirauhasten polyteenikromosomien suuri koko vaikuttikin osaltaan siihen, että kärpäsistä tuli tärkeä mallieläin genetiikan tutkimukseen. Kromosomien poikkijuovakuviosta

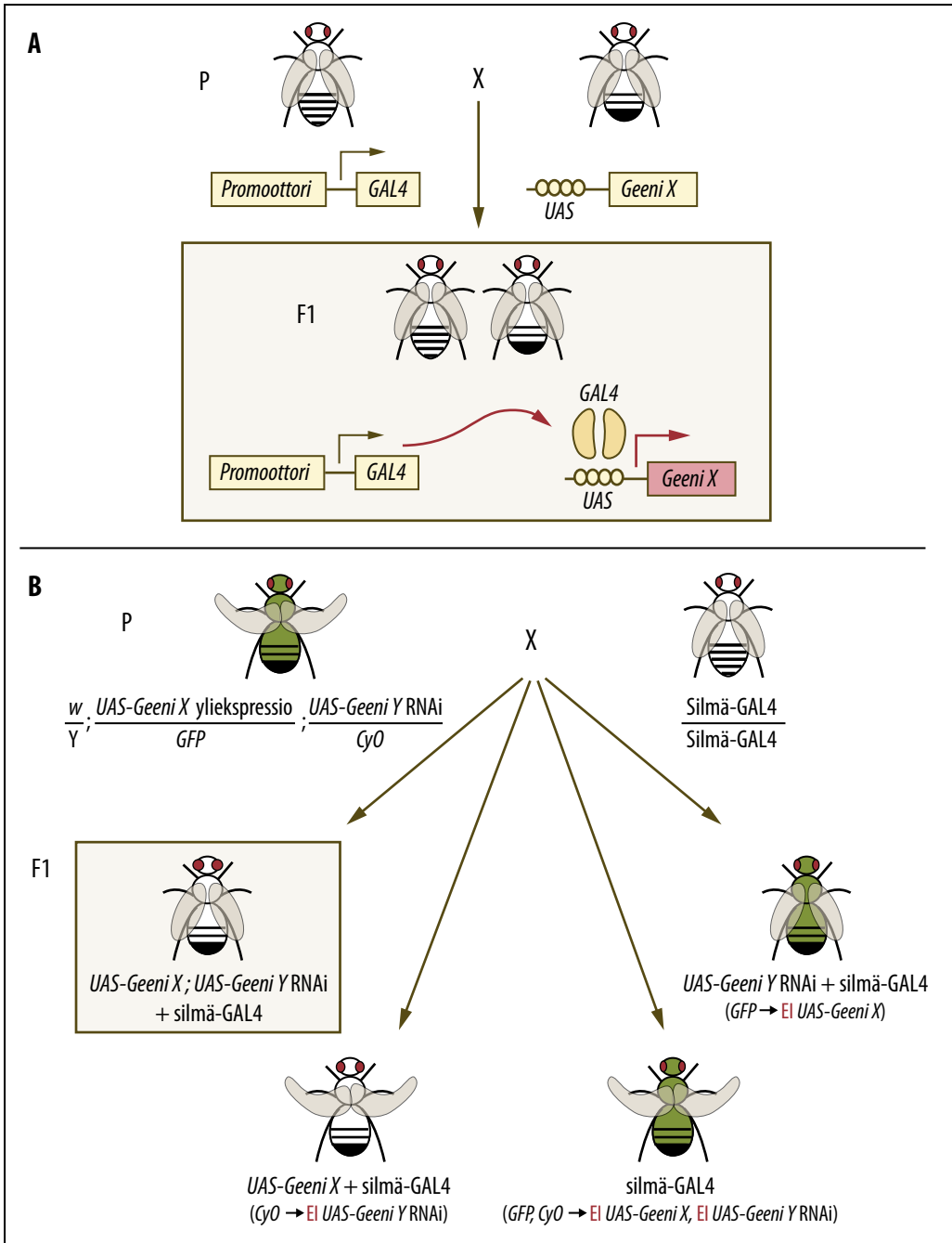
(banding pattern) oli mahdollista tunnistaa eri alueita ja numeroida ne. Myöhemmin geenien sijoittuminen näille kromosomien eri alueille voitiin osoittaa (Bridges 1935). Morganin työtoverin Calvin Blackman Bridgesin piirtämät sytologiset kromosomikartat ovat edelleenkin käytössä ja muodostavat perustan geenien paikantamisjärjestelmälle banaanikärpäs kromosomistossa. Sitten molekyylibiologian tutkimusmenetelmillä saadut tiedot on integroitu tähän klassiseen järjestelmään, ja koko genomia voi tutkia ja selata useissa tietokannoissa. Näistä paras ja kattavin on The mutants of *Drosophila melanogaster* -kirjaan (Bridges ja Brehme 1944) alun perin perustuva FlyBase (www.flybase.org) (Yamamoto 2010). Banaanikärpäsellä on diploidinen kromosomisto, jonka kromosomiluku on $2n = 8$. Kromosomipareista yksi on sukupuolikromosomipari (X ja Y), jota merkitään myös numerolla 1, ja kolme on autosomeja (kromosominumerot 2–4). Neljäs kromosomi on hyvin pieni, ja siinä on vain vähän geenejä sisältävää eukromatiinia (Adams ym. 2000). Geneettinen rekombinaatio meioosissa eli tekijänvaihto (crossing over) puuttuu banaanikärpäskoirailta (Morgan 1914). Tämä on tutkimuksen kannalta erittäin hyödyllinen ominaisuus, sillä tuotettu mutaatio kromosomissa ei voi hävitä rekombinoitumalla, jos se on koiraspuolella.

Geneettisen muuntelun mahdollisuudet banaanikärpäsessä

Banaanikärpäs parhaimpiin ominaisuuksiin mallieläimenä kuuluvat monipuoliset geneettisen manipulaation mahdollisuudet. Yli sadan vuoden ajan tehty banaanikärpäs tutkimus on johtanut valtavaan määrään geneettisen tutkimuksen työkaluja (Rubin ja Lewis 2000). Eräs parhaimmista tällaisista työkaluista on balanserikromosomit. Niiden käyttöä tutkimuksessa kehitti vuonna 1946 Nobel-palkittu Herman Joseph Muller löydettyään X-kromosomin alleelin, jossa tekijänvaihtoa vastin-kromosomien välillä ei tapahtunut (Muller 1918). Myöhemmin ymmärrettiin, että tekijänvaihdon estyminen johtui kromosomissa olevasta inversiosta (Sturtevant 1921). Ba-

lanserikromosomi on yleensä keinotekoisesti muokattu kromosomi, johon on tuotettu useita inversioita ja duplikaatioita. Ne estävät kromosomin paritumisen ja rekombinaation vastinkromosomin kanssa. Balanseri sisältää lisäksi vallitsevan markkerigeenin, jonka avulla balanserikromosomin voi tunnistaa heterotsygoottisessa yksilössä, sekä peittyvän letaalin mutaation, jonka ansiosta balanserin suhteen homotsygoottisia yksilöitä ei synny. Näiden ominaisuuksiensa vuoksi balansereita käytetään tietyn homotsygoottisena letaalin tai steriilin alleelin ylläpitämiseen sekä vastinkromosomin mutaatioiden säilyttämiseen (Greenspan 2004).

UAS-GAL4-menetelmä. Yhdeksi parhaita ja käytetyimmistä molekyylibiologisista työkaluista geeniekspression muunteluun banaanikärpäsessä on osoittautunut hiivasta peräisin oleva kahdesta yksiköstä koostuva UAS-GAL4-menetelmä. Siinä halutun geenin ilmentyminen (tai vaimentuminen) aktivoituu, kun GAL4-transkriptiotekijä sitoutuu geenistä ylävirtaan sijaitsevaan kohdesekvenssiin eli UAS-alueeseen (Upstream Activating Sequence). Kun kohdegeeniä halutaan ilmentää, geenin koodaava sekvenssi liitetään UAS-alueeseen. Jos taas kohdegeeni halutaan vaimentaa, UAS-alueeseen liitetään sekvenssi, joka tuottaa geeniä vastaavaa kaksisäikeistä RNA:ta (dsRNA) esimerkiksi silmukoinnilla (Duffy 2002). Syntyvä kaksisäikeinen RNA vaimentaa geenin ilmentymisen. UAS-GAL4-menetelmän hienous banaanikärpäsessä perustuu siihen, että aktivoitava UAS-sekvenssi ja GAL4-transkriptiotekijä ylläpidetään eri banaanikärpäs linjoissa: Ensimmäisessä linjassa kohdegeeni ei aktivoidu, koska aktivoivaa GAL4-proteiinia ei ole. Toisessa linjassa taas tuotetaan GAL4-proteiinia, jolla ei ole kohdesekvenssiä, mihin sitoutua. Siten voidaan ylläpitää esimerkiksi linjoja, joiden kohdegeenien epänormaali ilmentyminen aiheuttaisi letaalin tai steriilin fenotyypin. Ainoastaan risteyttämällä nämä kaksi linjaa saadaan aikaan geenin aktivaatio tai vaimentuminen (KUVA 2A) (Brand ja Perrimon 1993, Duffy 2002). GAL4-linjoja, jotka ilmentyvät kärpäs eri kudoksissa ja eri kehitysvaiheissa, on saata-



KUVA 2. A) UAS-GAL4-menetelmä. GAL4-transkriptiotekijää tuottava banaanikärpaskanta risteytetään kärpaskannan kanssa, jossa haluttu geeni X sijaitsee UAS-sekvenssin alaisena. Risteytyksen jälkeläisissä on sekä GAL4-tekijä että UAS-geeni X, jolloin GAL4:n sitoutuessa UAS-sekvenssiin saadaan aikaan geenin X aktivaatio. **B)** Esimerkkiristeytys, jolla tutkitaan geenin X yliekspression aiheuttamaa silmän liikakasvua sekä geenin Y RNAi-vaimennuksen vaikutusta. Siinä käytetään kärpäsiä, joilla on sekä UAS-geenin X yli-

ekspressiosiiirtogeeni että UAS-geenin Y RNAi-siirtogeeni, molemmat heterotsygooteina. Molempien siirtogeenien vastinkromosomina on balanserikromosomi, jossa on näkyvä markkerigeeni (toisessa kromosomissa GFP ja kolmannessa kromosomissa CyO). Kärpäset risteytetään silmäspesifisen homozygoottisen GAL4-kannan kanssa, jolloin saadaan neljänlaisia jälkeläisiä. Markkerigeenien avulla voidaan erotella kukin genotyyppi ja sen vaikutus silmän liikakasvuun.

villa tuhansia. Niistä voidaan valita kulloinkin tarkoitukseen sopiva linja.

GAL4-tekniikkaa voidaan käyttää myös useiden UAS-sekvenssien alaisten geenien ilmentämiseen tai vaimentamiseen samanaikaisesti. Kärpäsen balanserikromosomeja ja markkerigeenejä apuna käyttäen on mahdollista risteyttää samaan yksilöön useita siirtogeenejä, joiden yhteisvaikutusta halutaan analysoida. Esimerkkiristeytyksessä tutkitaan geenin X yli-ilmentymisen aiheuttamaa silmän liikakasvufenotyyppiä sekä geenin Y vaimentamisen vaikutusta siihen (KUVA 2A). Risteytyksessä käytetään kärpäsiä, joissa on sekä UAS-geenin X yliekspressiosiertogeeni että UAS-geenin Y RNAi-siirtogeeni, molemmat heterotsygootteina. Kummankin siirtogeenin vastinkromosomina on balanserikromosomi, jossa on näkyvä markkerigeeni: toisessa kromosomissa *GFP* (vihreä fluoresoiva proteiini) ja kolmannessa kromosomissa *CyO* (kiharat siivet). Kun nämä kärpäset risteytetään homotsygoottisen silmäspesifisen GAL4-kannan kanssa, saadaan aikaan neljänlaisia jälkeläisiä, joista markkerigeenien avulla voidaan erotella kukin genotyyppi ja sen vaikutus silmän liikakasvuun. Kokeessa voidaan siten todeta, että 1) geenin X yli-ilmentyminen aiheuttaa silmän liikakasvua, 2) geenin Y vaimentaminen RNAi-tekniikalla ei yksin vaikuta mitenkään silmän kasvuun ja 3) geenin Y vaimentaminen RNAi-tekniikalla yhtä aikaa geenin X yli-ilmentymisen kanssa pahentaa silmän liikakasvua (KUVA 2B).

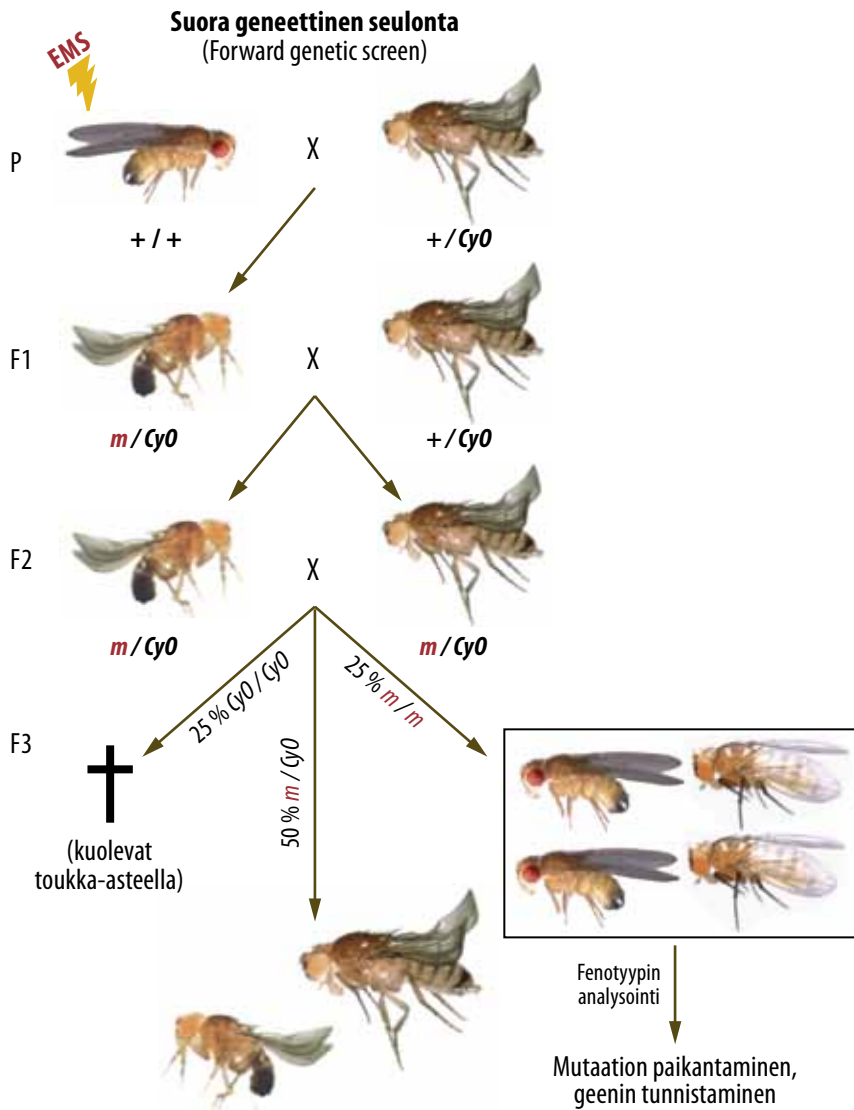
Suora genetiikka. Yksi tärkeimmistä välineistä tutkittavalle toiminnolle välttämättömien ennen tuntemattomien geenien löytämiseksi on laaja geneettinen mutaatioseulonta, joka on yksi suoran genetiikan (forward genetics) menetelmä. Banaanikärpäsisistä ja muista malliorganismeista, kuten sukkulamadoista ja seeprakaloista, voidaan tuottaa suuri määrä mutanttiyksilöitä, joista tunnistetaan kiinnostuksen kohteena oleva muuttunut ilmiö. Banaanikärpäsessä satunnaisia mutaatioita voidaan tuottaa esimerkiksi altistamalla kärpäset etyyylimetaanisulfonaatille (EMS) (KUVA 3) tai röntgensäteilylle (St Johnston 2002). Vuonna 1980 Christiane Nüsslein-Volhard ja Eric Wie-

TAULUKKO. Banaanikärpäsen etuja ja heikkouksia mallieläimenä.

Edut
Kasvatuksen helppous
Lyhyt sukupolvien väli
Taudinkestävyys
Selkärangattomana eettisesti hyväksyttävä mallieläin
Tehokkaasti toimiva RNAi
Useat ulkoiset ominaisuudet ovat hyviä mutaatiokohteita, koska ne tuottavat selkeän fenotyypin
Polyteenikromosomit
Geneettinen muunneltavuus
Tunnettu genomi
Pieni kromosomiluku
Balanserikromosomit
UAS/GAL4-menetelmä
P-elementtien käyttö
Mahdollisuus tuottaa geneettisesti mosaikkisia yksilöitä
Heikkoudet
Kärpäskantojen jatkuva ylläpito
Kärpäsiä ei voi pakastaa luotettavasti millään kehitysteella
Jatkuvia kärpässolusolulinjoja on vähän, eikä kaupallisia vasta-aineita ole saatavilla
Poikkeaa anatomisesti ihmisestä monilta osin, esim. ei suljettua verenkiertoa

schaus julkaisivat kemialliseen mutageneesiin perustuvan seulan, jossa pyrittiin löytämään ensimmäistä kertaa monisoluisessa organismissa kaikki tiettyyn prosessiin osallistuvat geenit (Nüsslein-Volhard ja Wieschaus 1980). Vuonna 1995 he saivatkin Nobel-palkinnon tästä mutaatioseulaan pohjautuneesta työstään, jossa löydettiin lukuisia banaanikärpäsen alkion polaarisuuteen vaikuttavia geenejä. Esimerkiksi immunologeille hyvin tuttu Toll-geeni on heidän nimeämänsä ja kuvastanee tutkijoiden riemua onnistuneen kokeen tuloksesta (toll = hienoa). Kuriositeettina voidaan mainita, että myöhemmin samaisen Toll-geenin havaittiin olevan välttämätön banaanikärpäsen immuunivasteelle hiivainfektioita vastaan (Lemaitre ym. 1996). Tämä oivallus johti ihmisen Tollin kaltaisten reseptorien (Toll-like receptors, TLR) immunologisen merkityksen ymmärtämiseen (Medzhitov ym. 1997, Rock ym. 1998). Ihmisen TLR:t ovat tärkeitä hahmontunnistusreseptoreita, jotka säätelevät sekä synnynnäistä että hankinnaista immuunivastetta. TLR:ien toiminnan ymmärtäminen

2067

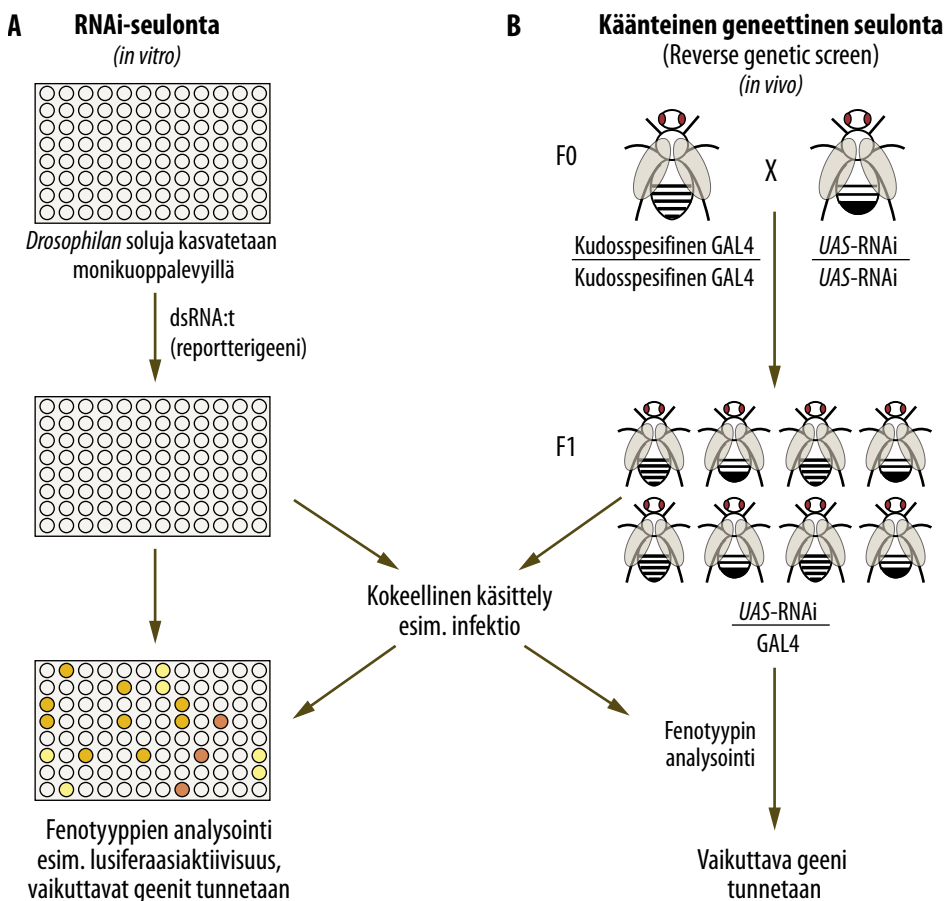


KUVA 3. Suora geneettinen mutaatioseulonta. P-sukupolven banaanikärpäsurekset altistetaan kemialliselle mutageenille (EMS), joka aiheuttaa genomiin pistemutaatioita. Kukin uros, jonka siittiösoluista osa on mutatoitunut, risteytetään naaraiden kanssa, joilla on näkyvällä markkerigeenillä (*CyO*) merkitty balanserikromosomi, mutta jotka ovat muuten villityypisiä ($+/CyO$). F1-jälkeläiskantojen *CyO*-urokset ris-

teytetään uudelleen $+/CyO$ -naaraiden kanssa, jolloin F2-sukupolvessa saadaan mutaation suhteen balansoitu kanta (m/CyO). Mutaatiokannat voidaan ylläpitää F2-sukupolvessa balansoituna. F3-sukupolven kärpäset, joilla ei ole markkerigeeniä, ovat kunkin mutaation suhteen homotsygoottisia yksilöitä, ja niiden fenotyypit voidaan analysoida.

antaa mahdollisuuden rationaalseen rokotteiden suunnitteluun, jonka avulla toivottavasti pystytään välttämään rokotteiden aiheuttamista haittavaikutuksilta. Tällä hetkellä TLR:ien ligandit ovatkin keskiössä uusien rokotteiden adjuvantteja kehitettäessä (Duthie ym. 2011).

Mutaatioita voidaan tuottaa myös niin sanotulla P-elementti-insertiotekniikalla (Engels 1983), jossa banaanikärpäsellespesifinen transposoni eli P-elementti liittyy genomiin häiriten insertiokohdan geenien toimintaa. P-elementtitekniikan yleinen strategia on



KUVA 4. RNA-häirintään perustuva seulonta banaanikärpäsen viljellyissä soluissa (A) ja banaanikärpäsessä *in vivo* (B). **A)** Banaanikärpäsen soluja viljellään monikuoppalevyillä, ja kullekin kuopalle lisätään haluttua geeniä vastaavaa dsRNA:tä. Solut ottavat reseptorivälitteisesti sisään pitkä dsRNA-juosteet suoraan elatusnesteestä ja lopettavat tehokkaasti ja spesifisesti kohdegeenin ilmentymisen. Soluihin voidaan samalla transfektoida reportterigeeni, jonka aktiivisuutta (esim. lusiferaasi) koehenkilössä mitataan. Näin saadaan selville kohdegeenin

vaimentamisen vaikutus mitattavaan prosessiin. **B)** UAS-GAL4-menetelmällä voidaan RNA-häirintää käyttää myös elävissä kärpäksissä kohdistuen vaikutus halutulla GAL4-promootorilla joko koko eliöön tai haluttaessa tiettyyn kudokseen tai kehitystapaan. F1-sukupolven kärpäksissä, joissa on sekä GAL4-transkriptiotekijä että UAS-sekvenssin alainen vaimentava RNAi-siirtogeeni (*UAS-RNAi*), geeni on vaimentunut halutussa kudoksessa. Kohdegeenin vaimentamisen vaikutus voidaan analysoida F1-kantojen fenotyypeistä.

käyttää seulontaan valmiita Berkeley Genome projectissa tuotettuja banaanikärpäsen P-elementti-insertiokantoja (Spradling ym. 1999), joita on kaupallisesti saatavilla tuhansia. P-elementti-insertion hyvä puoli EMS-mutageneesiin tai röntgensäteilyaltistuksen aiheuttamaan mutageneesiin verrattuna on se, että vaikuttava geeni on helppo tunnistaa käyttämällä apuna P-elementin tunnettua sekvenssiä.

Käänteinen genetiikka. Perinteisten mutaatioseulontojen rinnalle tutkittavaan prosessiin osallistuvien geenien selvittämiseksi on viime vuosikymmeninä tullut useita elegantteja molekyylibiologisia menetelmiä. Niiden avulla voidaan muuttaa halutun geenin ilmentymistasoa ja tutkia muutoksen vaikutusta fenotyyppiin (käänteinen genetiikka, reverse genetics). Näitä ovat esimerkiksi ituradan

solujen transformaatio (Rubin ja Spradling 1982), halutun geenisekvenssin muuttaminen homologisen rekombinaation avulla (Rong ja Golic 2000) sekä RNA-häirintään (RNA-interferenssi, RNAi) perustuvat menetelmät (Carthew ja Sontheimer 2009, Hammond ym. 2000). Geenin vaimentamiseen RNA-häirintäteknikalla banaanikärpässä käytetään yleensä UAS-GAL4-menetelmää.

RNA-häirintä – mahdollisuus genomilaajuiseen toiminnalliseen kartoitukseen

Pian keksimisensä jälkeen (Fire ym. 1998) RNA-häirintä osoittautui oivalliseksi työkaluksi laaja-alaiseen geenien toiminnan seulomiseen banaanikärpäsien viljelyssä soluissa (Ramet ym. 2002). Banaanikärpäsien solut tunnistavat solun sisälle päässeeseen kaksisäikeiseen RNA:n (dsRNA, double-stranded RNA) ja pilkkovat sen lyhyiksi siRNA:iksi (small interfering RNA), jotka sitoutuvat sekvenssiltään vastaavaan lähetti-RNA:han estäen sen ilmentymisen proteiiniksi. Ilmiö tapahtuu sekä viljelyssä soluissa että elävien banaanikärpäsien soluissa. Viljelty S2-solut ottavat reseptorivälitteisesti pitkät, mieluiten noin 1000 emäsparia sisältävät dsRNA-säikeet suoraan elatusnesteestä (Ulvila ym. 2006) ja lopettavat kohdegeenin ilmentymisen erittäin tehokkaasti ja pääsääntöisesti täysin spesifisesti (Kleino ym. 2005). Menetelmän helppous ja banaanikärpäsien genomien sekvenssin valmistuminen (Adams ym. 2000) ovat mahdollistaneet lukuisten genomilaajuisten RNAi-seulojen tekemisen tässä tutkimusmallissa (KUVA 4A) (Boutros ym. 2004, Kallio ym. 2010, Valanne ym. 2010). Banaanikärpäsitutkimus on samalla pohjannut menetelmien kehittämistä myös nisäkässoluihin, joissa RNAi-ilmio myös toimii. Niissä sen hyödyntäminen on kuitenkin interferonivasteen vuoksi hankalampaa ja vaatii lyhyiden siRNA-molekyylien käyttämistä.

Hyödyntämällä aiemmin kuvattua UAS-GAL4-menetelmää voidaan RNA-häirintää käyttää myös elävissä kärpäsissä. Vaikutus

joko koko eliöön tai haluttaessa tiettyyn kudokseen tai kehitystasoon (KUVA 4B) (Brand ja Perrimon 1993). Tällä hetkellä on saatavilla koko genomien kattavia RNAi-kirjastoja (Dietzl ym. 2007), joiden avulla pystytään tekemään genomilaajuisia RNAi-seulontoja in vivo (Cronin ym. 2009, Pospisilik ym. 2010). RNAi:n yhdistäminen UAS-GAL4-menetelmään tarjoaa usein mahdollisuuden selvittää tutkittavan geenin merkitystä, vaikka kyseinen geenituote olisi välttämätön banaanikärpäsien kehitykselle, sillä geenin ilmentyminen voidaan tällä menetelmällä vaimentaa esimerkiksi vasta kriittisimmän kehitysvaiheen jälkeen.

Lopuksi

Kun Thomas Hunt Morgan valitsi banaanikärpäsien tutkimuksensa mallieläimeksi viime vuosisadan alussa, hän tuskin aavisti, millaiseksi menestystarinaksi se osoittautuisi. Kolumbian yliopistosta banaanikärpäset ovat levinneet Morganin oppilaiden ja näiden perillisten mukana kaikkiin maailman johtaviin yliopistoihin, myös tänne Pohjolaan. Eettisessä mielessä tutkijoiden on aina muistettava käyttäjä mahdollisimman kehittymätöntä mallieläintä, joka kuitenkin mahdollistaa halutun asian tutkimisen. Banaanikärpäsillä on lukuisia etuja, muun muassa helppo ja halpa ylläpito sekä geneettisten menetelmien kehittyneisyys. On siis selvää, että banaanikärpäsien käyttö lääketieteellisen tutkimuksen mallina lisääntyy myös meillä, sillä banaanikärpäsellä on varmasti vielä paljon salaisuuksia paljastettavanaan. ■

SUSANNA VALANNE, Ph.D

MIKA RÄMET, professori, ylilääkäri

Tampereen yliopisto, biolääketieteellisen teknologian yksikkö ja
Tampereen yliopistollinen sairaala, lastentautien klinikka

SIDONNAISUUDET

Susanne Valanne: Vastaa Tampereen yliopiston banaanikärpäs-laboratorion toiminnasta (<http://cofa.uta.fi/> -> Drosophila laboratory).

Mika Rämet: Vastaa Tampereen yliopiston banaanikärpäs-laboratorion toiminnasta (<http://cofa.uta.fi/> -> Drosophila laboratory).
Luentopalkkio (Schering-Plough).

KIRJALLISUUTTA

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, ym. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 2000;287:2185–95.
- Ashburner M, Golic KG, Hawley RS. *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2005.
- Bonner JM, Boulianne GL. *Drosophila* as a model to study age-related neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. Exp Gerontol 2011;46:335–9.
- Boutros M, Kiger AA, Armknecht S, ym. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. Science 2004;303:832–5.
- Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 1993;118:401–15.
- Bridges CB. Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J Hered 1935;26:60–4.
- Bridges CB, Brehme KS. The mutants of *Drosophila melanogaster*. Washington: Carnegie Inst., Washington pub. 1944.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 2009;136:642–55.
- Cronin SJ, Nehme NT, Limmer S, ym. Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. Science 2009;325:340–3.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, ym. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. Nature 2007;448:151–6.
- Duffy JB. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. Genesis 2002;34:1–15.
- Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. Immunol Rev 2011;239:178–96.
- Engels WR. The P family of transposable elements in *Drosophila*. Annu Rev Genet 1983;17:315–44.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, ym. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998;391:806–11.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, ym. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. Nature 2011;471:473–9.
- Greenspan RJ. Fly pushing, the theory and practice of *Drosophila* genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2004.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 2000;404:293–6.
- Kallio J, Myllymäki H, Grönholm J, ym. Eye transformer is a negative regulator of *Drosophila* JAK/STAT signaling. FASEB J 2010;24:4467–79.
- Kleino A, Valanne S, Ulvila J, ym. Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. EMBO J 2005;24:3423–34.
- Lemaître B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell 1996;86:973–83.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997;388:394–7.
- Morgan TH. No crossing over in the male of *Drosophila* of genes in the second and third pairs of chromosomes. Biological Bull 1914;26:195–204.
- Morgan TH. Sex-limited inheritance in *Drosophila*. Science 1910;32:120–2.
- Muller HJ. Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. Genetics 1918;3:422–99.
- Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, ym. A whole-genome assembly of *Drosophila*. Science 2000;287:2196–204.
- Myllykangas L, Heino T. Kärpänen aivosa-rauksien tutkimusmallina. Duodecim 2006;122:443–50.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. Nature 1980;287:795–801.
- Pospisilik JA, Schramek D, Schnidar H, ym. *Drosophila* genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate. Cell 2010;140:148–60.
- Ramet M, Manfrulli P, Pearson A, ym. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. Nature 2002;416:644–8.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, ym. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. Genome Res 2001;11:1114–25.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastlein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:588–93.
- Rong YS, Golic KG. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. Science 2000;288:2013–8.
- Rubin GM, Lewis EB. A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. Science 2000;287:2216–8.
- Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science 1982;218:348–53.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, ym. Comparative genomics of the eukaryotes. Science 2000;287:2204–15.
- Spradling AC, Stern D, Beaton A, ym. The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. Genetics 1999;153:135–77.
- St Johnston D. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. Nat Rev Genet 2002;3:176–88.
- Sturtevant AH. A case of rearrangement of genes in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 1921;7:235–7.
- Ulvila J, Parikka M, Kleino A, ym. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. J Biol Chem 2006;281:14370–5.
- Valanne S, Myllymäki H, Kallio J, ym. Genome-wide RNA interference in *Drosophila* cells identifies G protein-coupled receptor kinase 2 as a conserved regulator of NF-kappaB signaling. J Immunol 2010;184:6188–98.
- Yamamoto MT. *Drosophila* Genetic Resource and Stock Center; The National BioResource Project. Exp Anim 2010;59:125–38.

Summary

Fruit fly – genetically excellent model animal for research

Drosophila melanogaster, i.e. the fruit fly is a familiar nuisance in late summer. For those living in a country plagued by myriads of flying insects, it is difficult to think any other model animal as an ethically more suitable research tool. Due to its genetic manipulability, the fruit fly is an excellent research model, but mainly due to lack of experience, has been utilized only to a small extent in medical research in Finland. For instance, the readily available transgenic RNAi strains have made functional, genome-wide screening possible in a complete organism or in a designated tissue.